

研究の背景

体内に投与された化合物は薬物代謝酵素により様々な代謝物に化学変換される。これら代謝物が実際に効果を発揮する場合や、副作用の本体となることがあるため医薬品開発において代謝物検索は重要である。このような代謝を含む ADME の問題で医薬品開発が中断するケースが多い。そのため、医薬品候補物質の段階で代謝物を確定することは医薬品開発における不成功確率を低下させ効率化につながると考えられる。

薬物代謝の第一相反応の約 90% を担うのがシトクロム P450 である。この酵素は酸素分子の還元的活性化を行い非常に強力な酸化活性種を生成し、炭化水素の水酸化、芳香環の水酸化、N-脱アルキル化、O-脱アルキル化、S-酸化など様々な反応を触媒する。これらの既知代謝反応を念頭におき、反応点の電子密度、立体障害を考慮すれば、かなりの確率で化合物の構造から代謝物を予測することが可能である。このような状況下で代謝物予想の確度を向上させる方法として、シトクロム P450 が触媒する未知反応様式を明らかにすることが上げられる。

この考えに基づき、我々は様々な新規シトクロム P450 触媒反応を検索し、フェノール類の *ipso* 位代謝や、芳香族アミン類、フェノール類のカップリング反応を明らかにしてきた。さらに反応機構の解析、環境ホルモン類の *ipso* 位新規代謝様式の解明などを行ってきた。以下に解明したビスフェノール A (BPA) の新規代謝様式を示す (Fig. 1)。

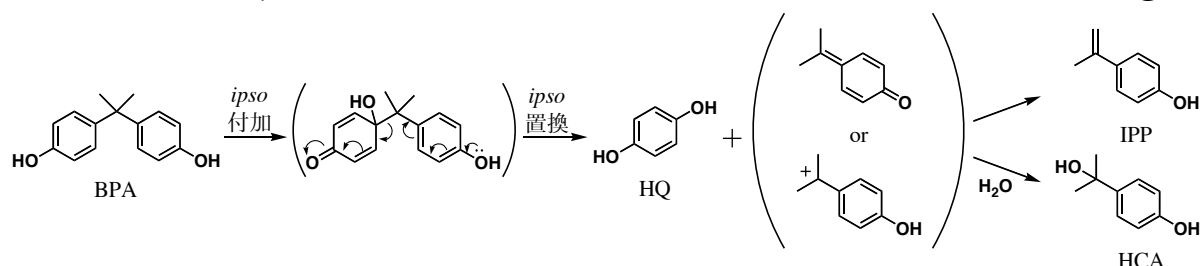


Fig. 1 ビスフェノール A の新規代謝様式

研究目的

置換フェノール類は既知の酸化反応に加え *ipso* 付加と *ipso* 置換反応を受けるが、いずれが進行するかは置換基の種類によって決まることを示してきた。この代謝反応のスイッチングを実際の医薬品や環境物質の構造から推測し、それらが P450 反応で得られることを証明する。これらの結果の蓄積は、化合物の構造から代謝物を予測する確率の向上につながる。

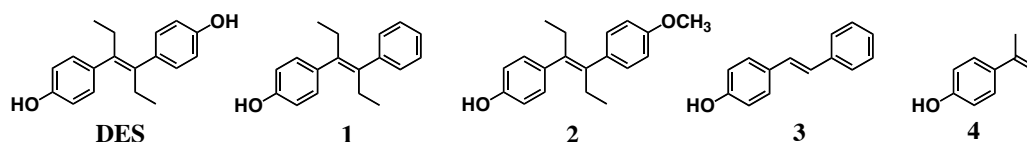


Fig. 2 DES およびモデル化合物

すでに明らかにした BPA の新規代謝様式をもとに、ジフェノールメタン骨格を有する医薬品ビスコジルの活性体 (デアセチルビスコジル)、ならびに有機塩素系殺虫剤メトキシクロルの *ipso* 位代謝様式を推定し、実際にその代謝物が得られることを中間発表会までに明らかにした。今回は合成エストロゲンである diethylstilbestrol (DES) の 2 つのフェノール環が共役した構造に着目した。本研究では、DES およびモデル化合物 (Fig. 2) について ¹O₂ によるキノール体合成反応とラット肝ミクロソーム系代謝反応

とを比較し、既知の代謝反応と *ipso* 位代謝反応を検討した。

実験・結果

1. モデル化合物の合成 **1** は低原子価チタンを用いたカルボニル化合物の還元カップリング (McMurry 反応) によって合成した。**2** は DES に 1 当量の硫酸ジメチルを反応させて得た。**4** は Wittig 反応により合成した。

2. 一重項酸素による化学的酸化反応 $^1\text{O}_2$ を用いて求電子的にキノール体を合成する反応を用いて、キノール体から脱離するヒドロキノン(HQ)の生成量を比較した。基質とローズベンガルをメタノールに溶解し、酸素雰囲気下、超高圧水銀ランプにより光を照射した。還元剤により生成物のヒドロペルオキシドを還元し、キノール体とした後、アスコルビン酸水溶液でさらに還元し、TMS 誘導体化して GC-MS にて定量した (Table 1)。いずれの化合物でも HQ が生成した。

Table 1 $^1\text{O}_2$ を用いた反応による HQ の生成量

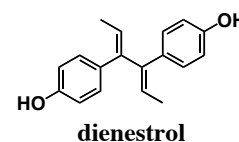
DES	1	2	3	4
464	137	212	1	95
			15	

(nmol)

3. ラット肝ミクロソームによる代謝反応 DES および **1**~**4** を基質とし、ラット肝ミクロソームを用いて反応を行い、GC-MS で生成物を解析した。DES では HQ の生成は見られなかったが **1**~**4** では生成が確認された (Table 2)。また、DES について既知代謝物である

Table 2 ラット肝ミクロソーム系による HQ の生成量

	DES	1	2	3	4
Complete	<0.01	0.83±0.02	0.84±0.07	0.31±0.02	1.2±0.1
NADP ⁺ (-)	N.D.	<0.01	<0.01	N.D.	0.17±0.01
Microsome (-)	N.D.	<0.01	<0.01	N.D.	0.1±0.03



dienestrol を定量

したところ、0.62 nmol/nmol P450 であった。

考察・結論

$^1\text{O}_2$ による酸化実験より、DES はキノール体が生成した場合、さらに *ipso* 置換反応が進行し HQ が生成することが明らかとなった。一方、ラット肝ミクロソーム代謝反応では HQ は確認されず、既知代謝物である dienestrol が確認されたことから、キノール体は生成しないことがわかった。また、**1**~**4** のようにフェノール性水酸基が 1 つの場合には、*ipso* 置換反応が進行することが明らかとなった。DES において *ipso* 位代謝反応が進行しなかったのは、DES の 2 つの共役したフェノールが一度に 2 電子とプロトンを引き抜かれ、dienestrol となったために *ipso* 位にラジカルがほとんど分布しなかったことが考えられる (Fig. 3)。以上より、共役した 2 つのフェノール環を有する構造では *ipso* 位代謝反応が進行しにくいことが明らかとなった。

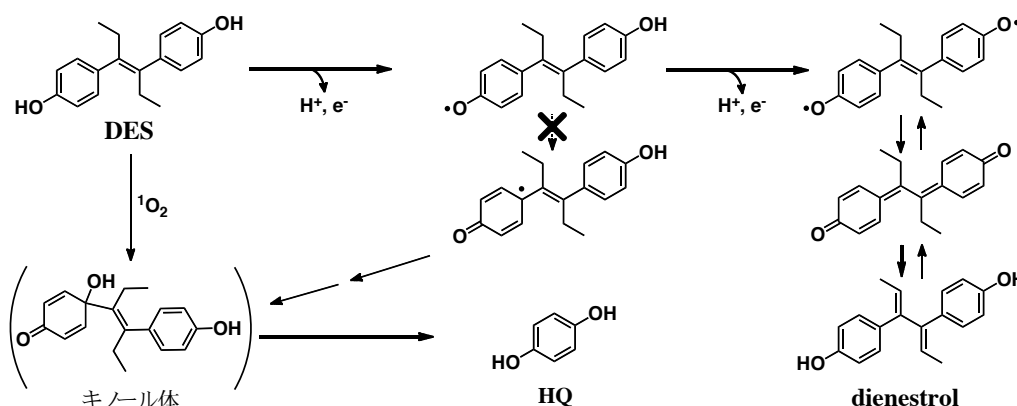


Fig. 3 DES の 2 電子酸化反応

食品由来の薬物代謝酵素に影響を及ぼす成分の探索 薬物送達を指向した機能性糖鎖の開発

天然医薬資源学講座 木内文之、羽田紀康、成川佑次

1. 当講座ではこれまでに薬用植物およびサプリメント素材に含有される薬物代謝に影響を及ぼす成分の探索研究を行い、中間報告ではシソ科ハーブ類に含有される各種解毒酵素の誘導活性成分およびネパール産プロポリスに含有される薬剤排出トランスポーターである BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) 阻害活性成分等について報告を行った。

今回は薬用植物由来のエストロゲン硫酸転移酵素(E-ST)阻害活性成分の探索研究について報告する。エストロゲン硫酸転移酵素 (E-ST) はエストロゲンの不活化を行う酵素であり、低濃度のエストロゲンに対し強い親和性を有することから、エストロゲン代謝において重要な役割を果たしている。ハーブや野菜などの食品由来成分や医薬品が E-ST を阻害することが知られており、E-ST 阻害活性は疾患のリスクや薬物治療を考える上で重要な要素となると考えられる。我々は婦人科疾患に繁用される生薬を中心にヒト肝サイトゾルを酵素源として、³[H]-estradiol の硫酸抱合阻害を検討し、ショウキョウ、オウレン、オウバク、ケイヒ、カンゾウ、ヤクモソウなどの抽出物に強い阻害活性を見出した。今回、婦人科疾患に特化して用いられる生薬であるヤクモソウ(益母草, *Leonurus japonicus* Houtt. 又は *Leonurus sibiricus* L. の地上部)に着目し成分探索を行うとともに消化管モデル細胞である Caco-2 を用いたエストロゲンの硫酸抱合に対する影響およびそれに関わる因子の mRNA 発現について検討を行った。

肝サイトゾルを用いたアッセイでは、アセトン抽出物から得られたジテルペン (Fig. 1) のうち、**5**~**8**, **11** に E-ST 阻害活性が認められた。一方、13-16 位がフラン環ではない化合物には阻害活性は認められなかった。最も強い阻害活性を示したのは**7**でその IC₅₀ 値は 7.9 μM であった。これに対し、細胞レベルでの代謝実験では**7**は活性を示さず、**5, 6, 8, 14**に阻害活性が認められ、7-9 位に enone 構造を有する化合物が代謝阻害活性を示す傾向が見られた。また、**5**はSULT1E1のmRNAの発現量を減少させる傾向を示したことから、転写レベルにおいても E-ST 活性に影響を与える可能性が示唆された。

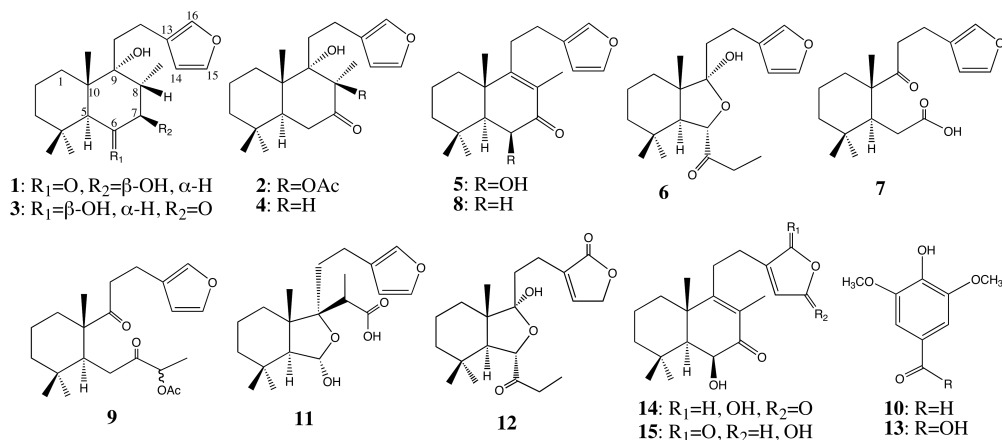


Fig. 1. Structures of compounds isolated from Leonurus herb

2. 我々は高等動物からは見出されない糖脂質を無脊椎動物に求め、これらを合成することによりその機能解明及び創薬を目指している。これまでに、節足動物であるキシヤヤスデや原索動物であるホヤから見出された糖脂質に、メラノーマ細胞(B16F10)の増殖抑制及びFAK, Erkのリン酸化抑制活性を報告してきた。一方、海綿より見出されたD-フコース含有新規糖脂質 β -D-GalNAc1-4(α -D-Fuc1-3) β -D-GlcNAc1-Cer (Fig. 2: A)にNO産生抑制活性が報告されたことから、この糖鎖構造に着目し、数種のアナログ体を合成し、構造活性相関を検討してきた。その結果、NO産生抑制にはフコースがD体であることが必須であり、GalNAcをGalに置き換えても活性は低下することが確認された。今回、より天然型に近いセラミドを導入した糖脂質**1** (Fig. 2)と、D-フコースの結合位置が天然型と異なるFuc α (1-4)GlcNAcを合成し、構造活性相関を調べた (Fig. 3)。その結果、セラミド部も活性発現に多少の影響を与え、さらにD-フコースの結合位置はN-アセチルガラクトサミンの3位に必要であることが示唆された。

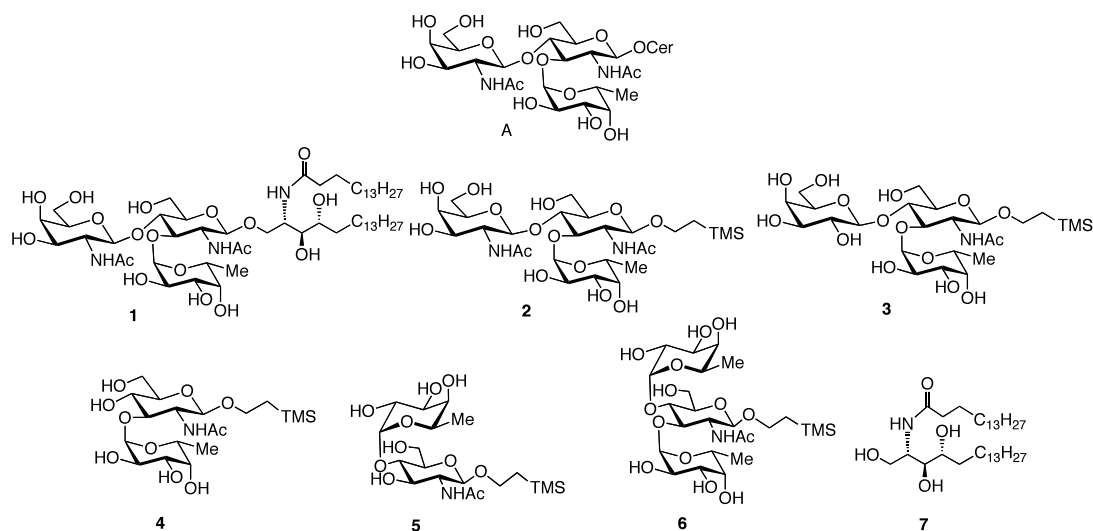


Fig. 2. Target glycosphingolipid (A) and the analogues **1**—**7**

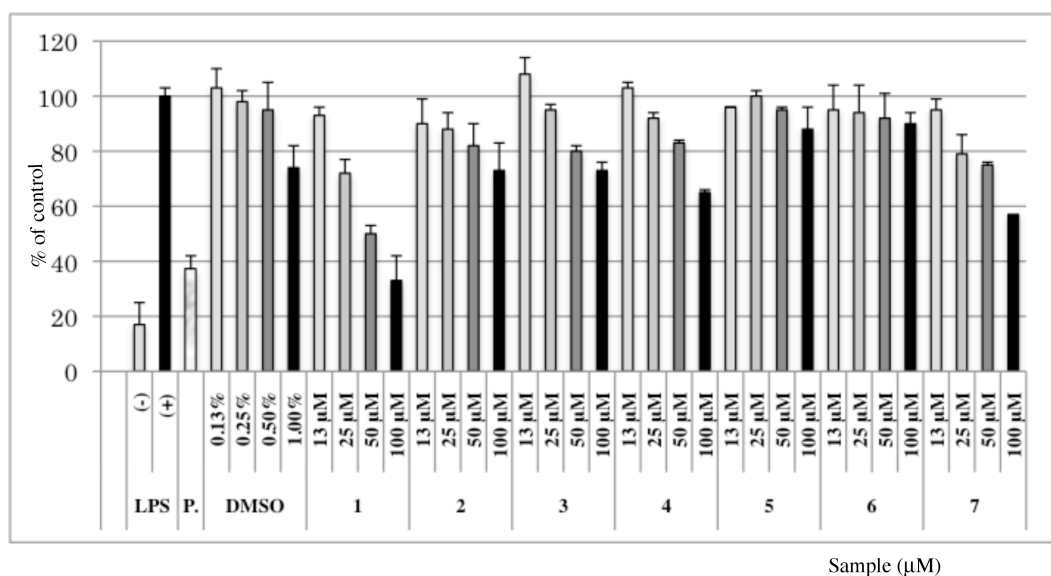


Fig. 3. Inhibitory effects of compounds **1**–**7** on NO production in LPS-activated J774.1 cells. Each bar represents mean \pm SD for quadruplet data. P: Positive control (L-NMMA), 50 μ M.

抗微生物薬の中樞神経系移行性とそれに影響を与える因子の解明による 副作用発現抑制 - 抗菌薬による痙攣誘発作用と構造活性相関 -

実務薬学講座 木津 純子

<はじめに>

抗菌薬，とくにカルバペネム系抗菌薬（カルバペネム薬）およびニューキノロン系抗菌薬（NQ薬）では，痙攣誘発の報告があり注目されている．とくに，1986年，NQ薬の一つである enoxacin と非ステロイド抗炎症薬（NSAIDs）の一つである fenbufen との併用時に痙攣が誘発されたという報告がなされ，NQ薬と NSAIDs 併用時の痙攣誘発について問題となっている．しかし，その痙攣誘発作用の強さ，構造活性相関，さらにはNQ薬と NSAIDs との薬物相互作用の強さに関する研究はほとんどない．本研究においては，これらの抗菌薬の痙攣誘発作用について，近年の新規化合物を含め痙攣誘発作用およびNQ薬と NSAIDs との薬物相互作用における構造活性相関に関し，より明確とすることができた．

<方法>

マウス（ddY系，5週齢，♂）の脳室内に，カルバペネム薬およびNQ薬を投与し，痙攣誘発作用を検討した．さらに，NQ薬を，NSAIDs（biphenylacetate および flurbiprofen，5 nmol）と同時投与（混合投与）し，痙攣誘発作用を検討した．

<結果および考察>

1. カルバペネム薬の痙攣誘発作用

Panipenem, imipenem は，マウス脳室内投与により，投与量依存的に痙攣が誘発された．一方，biapenem, meropenem では痙攣誘発作用は弱く，doripenem では，500 nmol/head まで痙攣を認めなかった（表1）．

この成績から，カルバペネム薬による痙攣誘発作用を動物実験で再現することができ，さらに，化合物により痙攣誘発作用に差のあることが明らかとなった．

表1 カルバペネム薬の痙攣誘発作用

	ED50 (nmol)		ED50 (nmol)
Panipenem	29.5	Biapenem	(418)
Imipenem	63.7	Meropenem	(445)
		Doripenem	No convulsion up to 500nmol/head

2. NQ薬の痙攣誘発作用，NSAIDs との薬物相互作用と構造活性相関

Norfloxacin, ciprofloxacin, gatifloxacin, lomefloxacin, enoxacin, sitafloxacin, levofloxacin, garenoxacin, moxifloxacin, sparfloxacin の脳室内投与により，マウスに投与量依存的に痙攣が誘発された．Norfloxacin および enoxacin の痙攣誘発作用は，biphenylacetate, flurbiprofen の同時投与により著しく増強された．

Ciprofloxacin および lomefloxacin の痙攣誘発作用は，biphenylacetate および flurbiprofen の同時投与により増強された．Sparfloxacin では痙攣誘発作用は弱く，これら NSAIDs の影響も受けないことが明らかとなった．一方，最近開発された NQ薬である garenoxacin, moxifloxacin では痙攣誘発作用は弱く，NSAIDs の同時投与によっても痙攣誘発作用の増強は認められなかった．Tsufloxacin は，痙攣誘発作用は弱く，500nmol まで痙攣を認めなかった（表2）．

表2に示すように、NQ薬の7位に遊離ピペラジニル基を有する化合物（norfloxacin, ciprofloxacin）では、強い痙攣誘発作用を有することが明らかとなった。また、これら2化合物に enoxacin（7位に遊離ピペラジニル基を有する）を加えた3化合物では、biphenylacetate および flurbiprofen の同時投与により、その痙攣誘発作用は著しく増強された。

これらの成績より、NQ薬の痙攣誘発作用には、7位の遊離ピペラジニル基の関与が考えられた。さらに、biphenylacetate, flurbiprofen との薬物相互作用には、7位ピペラジニル基が強く関与していることが示唆された。

3. 幼若マウスにおける NQ 薬の痙攣誘発作用と biphenylacetate, acetaminophen との薬物相互作用

Norfloxacin, ciprofloxacin, levofloxacin を3週齢および9～10週齢マウスの脳室内に投与したところ、投与量依存的に痙攣が誘発されたが、その痙攣誘発作用は5週齢マウスで認められたものと大きな差は認められなかった。Tosufloxacin では、500nmol まで痙攣を認めなかった。また、biphenylacetate との薬物相互作用は norfloxacin, ciprofloxacin で認められたが、5週齢で認められたものと大きな差は認められなかった。

この成績より、NQ薬の痙攣誘発作用・NSAIDs との薬物相互作用は、幼若マウスにおいても、5週齢と大きな差が無いことが示唆された。

< 結語 >

カルバペネム薬、NQ薬による痙攣誘発作用には化合物により差があり、さらに、NQ薬の痙攣誘発作用・NSAIDs との薬物相互作用には7位遊離ピペラジニル基が強く関与している可能性が考えられた。

表2 ニューキノロン薬の痙攣誘発作用とビフェニル酢酸・フルビプロフェンとの薬物相互作用 (数値はニューキノロン薬のED50, nmol/head)

	Free Piperazinyl Group at Position 7	no NSAIDs	biphenylacetate	flurbiprofen
Norfloxacin	Yes	12.9	0.49	0.19
Ciprofloxacin	Yes	17.0	5.0	6.9
Gatifloxacin	No	27.5	17.3	33.4
Lomefloxacin	No	30.8	5.5	11.3
Enoxacin	Yes	36.1	2.4	1.2
Sitafloxacin	No	50.6	35.4	64.8
Levofloxacin	No	75.2	62.7	74.9
Garenoxacin	No	104	105	98.9
Moxifloxacin	No	166	215	157
Sparfloxacin	No	199	158	89
Tosufloxacin	No	NC*	NC**	NC*

NC: not calculable

*: No convulsions were induced up to 500 nmol/head.

**: Convulsions were induced in 40% of mice at 500 nmol/head

表3 週齢別にみたニューキノロン薬の痙攣誘発作用とbiphenylacetate, acetaminophenとの薬物相互作用

		norfloxacin		ciprofloxacin		levofloxacin		tosufloxacin
		ED50	ratio	ED50	ratio	ED50	ratio	
3W	no NSAIDs	11.2	1	41.4	1	70.7	1	0
	biphenyl acetate	2.83	3.96	4.37	9.47	58.3	1.21	60
	acetaminophen	10.2	1.1	12.6	3.29	49.4	1.43	60
5W	no NSAIDs	10.1	1	19.1	1	70.7	1	0
	biphenyl acetate	0.73	13.8	5.4	3.54	65.7	1.08	40
	acetaminophen	10.3	0.98	26	0.73	76.5	0.92	0
9-10W	no NSAIDs	9.16	1	23.9	1	101.2	1	0
	biphenyl acetate	2.83	3.23	9.19	2.6	118.8	0.85	40
	acetaminophen	9.16	1	31	0.77	101.2	1	40

*convulsions induced (percent of mice) at 500 nmol/head

ED50: nmol

